



Universidade Federal do Pampa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
Campus São Gabriel

Exposição pré-imaginal ao Ferro causa alterações comportamentais similares ao autismo e modula a atividade de enzimas antioxidantes em *Drosophila melanogaster*

ANA BEATRIZ DOS SANTOS

2023

ANA BEATRIZ DOS SANTOS

Exposição pré-imaginal ao Ferro causa alterações comportamentais similares ao autismo e modula a atividade de enzimas antioxidantes em *Drosophila melanogaster*

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa — UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Thais Posser

**São Gabriel
2023**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais)

d237e dos Santos, Ana Beatriz

Exposição pré-imaginal ao Ferro causa alterações comportamentais similares ao autismo e modula a atividade de enzimas antioxidantes em *Drosophila melanogaster* / Ana Beatriz dos Santos. – 2023.
31 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Pampa, *Campus* São Gabriel, Ciências Biológicas, 2023.
Orientação: Thais Posser.

1. Transtorno do Espectro Autista. 2. Sobrecarga de Ferro. 3. *Drosophila melanogaster*. 4. Crescimento e Desenvolvimento. 5. Estresse oxidativo. 6. Bioquímica – Monografia. I. Posser, Thais. II. Universidade Federal do Pampa, *Campus* São Gabriel, Trabalho de Conclusão de Curso. III. Título

Exposição pré-imaginal ao Ferro causa alterações comportamentais similares ao autismo e modula a atividade de enzimas antioxidantes em *Drosophila melanogaster*

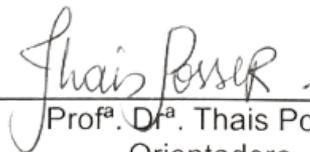
ANA BEATRIZ DOS SANTOS

ORIENTADORA: THAIS POSSER

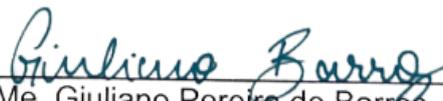
Monografia submetida à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 03 de fevereiro de 2023.

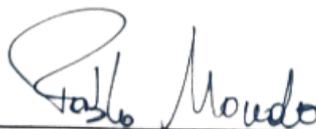
Banca Examinadora:



Prof.^a Dr.^a Thais Posser
Orientadora
UNIPAMPA



Prof. M^e. Giuliano Pereira de Barros
UNIPAMPA



Me. Pablo Echeverria Macedo
UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeira e principalmente, à Ariana, minha mãe, que sempre apoiou minhas escolhas (por mais distantes que fossem), acompanhou todos os momentos importantes da minha vida e auxiliou na construção de quem sou hoje. Se estou onde estou (e sou quem sou) é graças à minha mãe.

Agradeço, também, minhas irmãs, que sempre mostravam nosso cachorro por chamadas de vídeo; meu tio e tias, por todo apoio e compreensão; meus primos, por todo carinho; meu padrasto, por ajudar sempre que necessário; e minhas avós, Isabel e Luiza, que me permitiram uma vida repleta de sonhos. Sou grata, também, à Rita, que me acolheu como membro de sua família.

Além disso, sou grata aos meus amigos de graduação, que me acolheram e se tornaram meu porto seguro. Agradeço à Érika, por estar comigo em todos os momentos; à Bruna, por sempre me fazer rir; à Bianca, por me suportar durante toda graduação; à Thaís, por me abraçar em todos os momentos difíceis e aceitar abraçar a bioquímica após muita insistência; à Kellyn, por toda companhia; e ao Pietro, por surgir em nossas vidas. Estes escreveram parte da minha história e tornaram o fato de estar longe de casa mais suportável.

Agradeço, também, o Grupo de Pesquisa Estresse Oxidativo e Sinalização Celular, onde este estudo foi realizado. Agradeço a todos que tornaram este projeto possível ao me auxiliar sempre que necessário (principalmente na separação dos ovos). Agradeço à minha orientadora, Thais, por me proporcionar a oportunidade de participar do grupo e conhecer um organismo com o qual jamais pensei ser capaz de trabalhar (e hoje amo), além de aceitar o desenvolvimento do meu projeto.

Sou grata pelas amigadas que construí nesse grupo de pesquisa, principalmente Maria, Luana, Jacy e Karen. Obrigada por tornarem o ato de fazer ciência ainda mais divertido. Agradeço especialmente à Karen, minha co-orientadora, que me guiou magistralmente e tornou todo o processo mais leve, eliminando as inseguranças pelas quais passei durante a escrita deste, além de desenvolver uma amizade repleta de conversas tanto profundas quanto aleatórias.

Por fim, agradeço a todos que tiveram a paciência de me ouvir falando do organismo modelo utilizado neste trabalho, que sempre terá um lugar em meu coração. Agradeço todos organismos modelo, especialmente a *Drosophila melanogaster*, por tornarem a evolução da ciência possível.

RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por déficits na interação social, dificuldades na aprendizagem, déficits comunicativos e estereotipia. Aproximadamente 1 em cada 100 crianças é portadora do transtorno, que persiste por toda a vida, por conta disso estudar a etiologia do TEA é de suma importância. Cada vez mais, estudos mostram a forte relação entre fatores ambientais e genéticos na etiologia do TEA. Sabe-se que tanto a deficiência quanto o excesso de Ferro (Fe) durante o desenvolvimento embrionário está relacionado com transtornos do neurodesenvolvimento. A exposição a concentrações elevadas de Fe durante a gestação afeta negativamente a cognição, locomoção e o processo de aprendizagem de crianças, fatores comportamentais que relacionam-se com o TEA. O estresse oxidativo resulta da incapacidade do organismo no bloqueio dos efeitos nocivos dos radicais livres, causando danos celulares. A exposição excessiva ao Fe no período gestacional aumenta o estresse oxidativo, sendo o encéfalo suscetível aos danos causados pelos radicais livres, que são considerados um fator chave no deflagramento de diversos distúrbios neurológicos. A partir disso, torna-se relevante investigar o envolvimento do Fe na etiologia do TEA. O organismo modelo *Drosophila melanogaster* vem sendo amplamente utilizado no estudo de diversos distúrbios neurológicos, entre eles o TEA. Moscas adultas apresentam padrões comportamentais que podem ser utilizados para o estudo do caráter autista, como vem sendo demonstrado na literatura. Este organismo possui similaridades genéticas com inúmeros genes relacionados às doenças em humanos. Além disso, o fato de apresentar ciclo de vida curto, aliado à facilidade e baixo custo de manutenção, torna-o vantajoso em estudos do desenvolvimento. Dito isso, este estudo investigou a toxicidade do Fe no desenvolvimento de *D. melanogaster*, investigando indicadores de estresse oxidativo e alterações comportamentais que simulam o comportamento do tipo autista na mosca adulta já descritos na literatura. Com este objetivo, as moscas foram expostas a diferentes concentrações de Fe durante todo o ciclo de desenvolvimento até a eclosão das pupas. Moscas com até 5 dias de vida foram utilizadas para análises comportamentais e bioquímicas. Este estudo demonstrou que o Fe nas concentrações 5 e 15 mM induziu peroxidação lipídica, aumentou a atividade da enzima Superóxido Dismutase e inibiu a enzima Glutathione S-Transferase. As moscas expostas ao Fe apresentaram menor capacidade locomotora no teste de geotaxia negativa, maior frequência do comportamento do tipo repetitivo de *grooming* e menor interação social. Sendo assim, os dados obtidos neste estudo contribuem para um melhor entendimento dos fatores etiológicos implicados no TEA, chamando atenção para a toxicidade do Fe durante o período de desenvolvimento, podendo repercutir em transtornos como o TEA. Este trabalho também enfatiza o uso de *D. melanogaster* no estudo dos fatores etiológicos do autismo, entretanto mais estudos são necessários para um melhor entendimento deste processo.

Palavras-chave: Transtorno do espectro autista; Neurodesenvolvimento; Fatores ambientais; Estresse oxidativo; Comportamento do tipo autista.

ABSTRACT

Pre-imaginal exposure to Iron causes autistic-like behavioral changes and modulates antioxidant enzymes in *Drosophila melanogaster*

Autistic Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by social interaction deficits, learning difficulties, communicative deficits and stereotypy. It is known that about 1 in every 100 children reports this disorder, which persists during all life of the individual. Thus, the description of the etiology of this disorder becomes extremely relevant. Studies demonstrate the contribution of environmental and genetic factors for ASD etiology. It was demonstrated that both Iron (Fe) deficiency or overload during embryonic development are implied in neurodevelopmental disorders. It was also reported that prenatal exposure to high Fe levels is associated with ASD behavioral characteristics in children, such as learning, cognition and locomotion disorders. Oxidative stress results from an unbalance of antioxidant defense and levels of oxidant species leading to cellular damage. Exposure to augmented levels of Fe over gestational period leads to oxidative stress, especially in the brain which is sensitive to the damage induced by free radicals, being implied in several neurological disorders. Thus it becomes important to study the relation between Fe and ASD. The model organism *Drosophila melanogaster* has brought important contributions for the study of neurological disorders such as ASD. Characteristics like fast reproductive cycle, and genetic similarities of genes related to diseases in humans and a low maintenance cost make this model specially relevant for developmental studies. The present study investigated the Fe toxicity in the *D. melanogaster* models over the developmental period, taking into consideration factors like oxidative stress and behavioral changes which simulates the autistic-like behavior and are described in the literature for the study of ASD. For this purpose, *D. melanogaster* was exposed over the developmental cycle until the pupal eclosion to Fe concentrations. Flies up to 5 days old were used for biochemical and behavioral analysis. Fe exposure to 5 and 15 mM concentrations increased lipid peroxidation, and augmented the activity of Superoxide Dismutase whereas decreased Glutathione-S-transferase activity. The flies exposed to Fe displayed a decreased locomotor capacity in the negative geotaxis test, and a prolonged period displaying grooming, which is considered a repetitive behavior, and also an antisocial behavior. Thus, the present study contributes for a better comprehension of factors implied in ASD, and draws attention for Fe toxicity over developmental period, however, further studies are necessary to a better description of this process. Additionally, the use of *D. melanogaster* for investigation of factors which predisposes to autism was reinforced in this study.

Key-words: Autistic spectrum disorder; Neurodevelopment; Ambiental factors; Oxidative stress; Autistic like behavior.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Comportamentos de <i>grooming</i> em <i>D. melanogaster</i>	18
Figura 2 – Interação social em <i>D. melanogaster</i>	19
Figura 3 – Percentual de eclosão	20
Figura 4 – Atividade enzimática em <i>D. melanogaster</i>	21
Figura 5 – TBARS em <i>D. melanogaster</i>	21
Figura 6 – Capacidade locomotora de <i>D. melanogaster</i>	22
Figura 7 – Episódios de <i>grooming</i> em <i>D. melanogaster</i>	22
Figura 8 – Prejuízo na interação social em <i>D. melanogaster</i>	23

LISTA DE SIGLAS

AChE – Acetilcolinesterase

BSA – Albumina de soro bovino

Cd – Cádmió

EROs – Espécies reativas de oxigênio

Fe – Ferro

GSH – Glutathiona

GST – Glutathiona S-Transferase

Hg – Mercúrio

Pb – Chumbo

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido Dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TEA – Transtorno do Espectro Autista

SUMÁRIO

Resumo	vi
Abstract	vii
1. INTRODUÇÃO	11
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVO GERAL	15
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
5. MATERIAIS E MÉTODOS	16
6. RESULTADOS	20
7. DISCUSSÃO	23
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
9. REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma condição que tem como maior característica dificuldades na interação social, com o grau de dificuldade variando de acordo com a evolução da síndrome no indivíduo (White *et al.* 2006). Ou seja, pode-se afirmar que a severidade e sintomas do transtorno divergem entre os portadores, não havendo um padrão comportamental entre estes, podendo gerar sintomas mais leves ou severos de acordo com a evolução do transtorno no indivíduo (Volkmar & Wiesner 2018). Além disso, o TEA é uma condição séria, visto que persiste durante a vida do portador, ou seja, não há cura para tal transtorno. Ademais, o TEA afeta fatores como a socialização, comunicação, percepção e cognição, prejudicando a vivência do portador. Dito isso, nota-se que tal déficit pode apresentar alta severidade e seu início precoce induz maiores dificuldades em fatores relacionados à qualidade de vida, como aprendizagem e adaptação social (Volkmar & Wiesner 2018).

Apesar de casos terem sido observados anteriormente, o TEA foi descrito pela primeira vez apenas em 1943 pelo psiquiatra Leo Kanner, que analisou onze crianças portadoras do distúrbio e descreveu sintomas como a falta de interesse pelos indivíduos ao redor e atividades sociais em geral. Além disso, Kanner observou comportamentos como repetições, resistência à mudanças, deficiências de linguagem e insistência nas mesmas coisas, observando perturbação caso houvesse mudança na rotina. Além desses fatores comportamentais, Kanner observou episódios de pânico nas crianças caso determinado objeto fosse posto em um local diferente do habitual, seletividade quanto às roupas que vestiam e alimentos consumidos, bem como estereotípias como balanço corporal, andar na ponta dos pés e sacudir das mãos. Além desse conjunto de comportamentos, Kanner considerava o isolamento social um fator chave para diagnóstico do TEA (Kanner 1943).

Ao final da década de 1970, estudos chegaram à conclusão de que o TEA era caracterizado pelo déficit no desenvolvimento social, déficit comunicativo e linguístico, resistência à mudança, insistência na rotina e marcado por seu início precoce. Desde então, ocorreram mudanças no formato de diagnóstico do TEA, mas tais fatores comportamentais ainda são usados como marcadores característicos do transtorno (Volkmar & Wiesner 2018).

Segundo dados epidemiológicos mundiais, em média 1 em cada 100 crianças é portadora do TEA, sendo este valor uma estimativa propensa a apresentar maior número, visto que países em desenvolvimento possuem taxas desconhecidas (World Health Organization 2022). No Brasil, ainda não há números oficiais sobre pessoas com TEA, visto que o transtorno é pouco estudado no país. Caso esteja de acordo com estudos realizados em outros países, estima-se que cerca de 1,5 a 2 milhões de crianças brasileiras portem TEA (Brentani *et al.* 2021).

Apesar de diversos estudos relacionados ao TEA, a etiologia do transtorno ainda é desconhecida, havendo fortes evidências da influência genética (Kałużna-Czaplińska *et al.* 2017). Atualmente, o TEA é visto como um transtorno do neurodesenvolvimento relacionado com fatores etiológicos distintos, tanto genéticos quanto ambientais. Por conta da sua capacidade de interação com a vulnerabilidade genética, fatores ambientais também apresentam considerável importância no desenvolvimento do TEA. Dito isso, é possível que o transtorno tenha causas multifatoriais, derivadas da interação entre fatores genéticos e ambientais (Ramaswami & Geschwind 2018; Volkmar & Wiesner 2018; Bigolin 2020; Cheroni *et al.* 2020). Entre as interações que ocorrem durante o desenvolvimento pré-natal, pode-se citar o uso de determinados fármacos como o antiepilético valproato, consumo de álcool, deficiência de vitamina D, tabagismo e exposição aos metais pesados, como o Ferro (Gialloreti *et al.* 2019; Santos-Terra *et al.* 2021).

O desenvolvimento pré-natal humano dura cerca de 38 semanas, dividido nas fases embrionária (período de maior vulnerabilidade às anomalias congênitas, representada pelas oito primeiras semanas de gestação) e fetal, que representa o restante do período gestacional (cerca de 30 semanas). O sistema nervoso central (SNC) começa a se desenvolver na quarta semana de gestação, formando-se até o terceiro ano de vida do indivíduo. Por apresentar período duradouro de desenvolvimento, o SNC está exposto aos fatores ambientais capazes de causar alterações funcionais e morfológicas associadas ao enfraquecimento do sistema imunológico, alterações hormonais, interações genéticas e estresse oxidativo (Gialloreti *et al.* 2019; Ijomone *et al.* 2020).

O Ferro (Fe) consiste em um nutriente essencial e necessário no transporte de oxigênio a nível celular, além de realizar atividade metabólica e compor enzimas para a fosforilação oxidativa e síntese de neurotransmissores. Dito isso, tais fatores tornam o Fe um elemento essencial para o neurodesenvolvimento, sendo tanto seu

excesso quanto deficiência considerados danosos (Ijomone *et al.* 2020). Em particular, a exposição excessiva ao Fe no período gestacional aumenta o estresse oxidativo, podendo induzir transtornos do neurodesenvolvimento, entre estes o TEA. Estudos em humanos demonstraram que altas concentrações de Fe durante a gestação podem ser danosas para o neurodesenvolvimento do feto, afetando negativamente fatores como a aprendizagem, cognição e funções motoras (Yang *et al.* 2010; Mireku *et al.* 2015). Tamura *et al.* (2002) ressaltou os efeitos da sobrecarga de Fe durante a gestação ao observar que altas concentrações deste metal pesado no cordão umbilical estavam relacionadas com déficits na aprendizagem de humanos, enquanto Lönnerdal (2017) observou déficits cognitivos e locomotores em humanos recém-nascidos expostos à dieta suplementada com altas concentrações de Fe. A partir disso, a homeostase do Fe se demonstra essencial para o desenvolvimento normal do encéfalo, e compreender o papel do Fe em distúrbios do neurodesenvolvimento é de extrema importância para contribuir na geração de ações relacionadas à saúde (Georgieff & Innis 2005).

A falta de estabilidade entre a síntese das espécies reativas de oxigênio (EROs) e a habilidade do organismo de bloquear seus efeitos nocivos através dos antioxidantes causa o estresse oxidativo, que resulta em danos celulares. O encéfalo é um dos maiores metabolizantes de oxigênio, por conta disso muitas EROs acumulam-se nele. Contudo, seus mecanismos protetores são fracos, tornando-o sensível aos danos causados pelo acúmulo dos radicais livres (Pangrazzi *et al.* 2020). Sendo assim, um fator chave de diversos distúrbios neurológicos é o acúmulo de EROs. Muitos estudos ligam o TEA a altos níveis de EROs e menor capacidade antioxidante em todo o organismo, tanto no encéfalo quanto a nível sistêmico (Bjørklund *et al.* 2021).

Em portadores de TEA, a atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) é mais elevada, considerada um mecanismo na neutralização dos danos celulares advindos do estresse oxidativo no encéfalo (Pangrazzi *et al.* 2020). A Glutathione S-Transferase (GST) age na desintoxicação e está envolvida na regulação de proteínas importantes durante a diferenciação e desenvolvimento, podendo apresentar alterações em situações de estresse oxidativo (Alabdali *et al.* 2014). Enzima essencial na propagação dos impulsos nervosos, a Acetilcolinesterase (AChE) normalmente apresenta níveis reduzidos no plasma de humanos com autismo (Suzuki *et al.* 2011). A nível corporal, a peroxidação lipídica costuma ser

mais alta em indivíduos com TEA (Bjørklund *et al.* 2021). A exposição pré-natal aos metais pesados está relacionada com a alteração da produção da Glutathione (GSH), e deficiências no metabolismo da GSH são observadas nos portadores de TEA, que é dado como o principal mecanismo de defesa contra os radicais livres gerados pelos metais pesados (Ijomone *et al.* 2020).

Por conta de sua versatilidade, o organismo modelo *Drosophila melanogaster* vem sendo utilizado para o estudo de diversos distúrbios neurológicos. O uso do organismo no estudo desses distúrbios é justificado por conta de cerca de 75% dos genes relacionados à doenças em humanos possuírem homologia com os genes da mosca. Além disso, proteínas e vias de sinalização envolvidas em processos fisiológicos básicos são conservadas entre esses organismos eucarióticos. Características como o curto ciclo de vida, reprodução rápida e ampla variabilidade entre as gerações possibilita a avaliação de fatores que interferem no desenvolvimento em drosófilas, e a partir disso pode-se buscar extrapolar o conhecimento gerado com o uso deste modelo para o mesmonexo causal que ocorre no organismo humano (Coll-Tané *et al.* 2019).

Ademais, o organismo já vem sendo utilizado como modelo para estudos do TEA por conta de reproduzir comportamentos característicos do transtorno, além de ser amplamente utilizado como modelo na análise da toxicidade de metais (Shilpa *et al.* 2021; Demir & Turna 2022). A partir disso, diversos ensaios comportamentais podem ser realizados a fim de avaliar o comportamento do tipo autista na mosca, que reproduz o comportamento do tipo repetitivo, alterações sociais, alterações locomotoras, comportamento do tipo agressivo e aprendizagem e memória, fatores que reproduzem os comportamentos característicos dos humanos autistas no organismo modelo, além de possibilitar o estudo de diversos fatores etiológicos que podem estar relacionados com o TEA (Coll-Tané *et al.* 2019; Shilpa *et al.* 2021).

Dito isso, compreender o papel de fatores ambientais na etiologia do TEA é de extrema relevância, visto que ainda há pouco conhecimento sobre a etiologia do transtorno. Sendo assim, este estudo buscou avaliar os efeitos da exposição ao Fe em *D. melanogaster* durante o desenvolvimento, analisando fatores como estresse oxidativo e alterações comportamentais relacionadas ao TEA.

2. JUSTIFICATIVA

Os fatores ambientais capazes de contribuir no desenvolvimento do TEA vêm sendo cada vez mais estudados, evidenciando a existência de condições além da genética capazes de induzir o transtorno. Esses fatores podem influenciar o neurodesenvolvimento, podendo então induzir o transtorno ao interagir com fatores genéticos. A exposição excessiva ao Fe durante o desenvolvimento embrionário resulta em um maior estresse oxidativo, danoso para o encéfalo ao afetar fatores como a aprendizagem e cognição, facilitando a indução de transtornos do neurodesenvolvimento. Sendo assim, torna-se de extrema importância estudar os efeitos da exposição ao Fe durante o desenvolvimento a fim de investigar sua relação com o TEA, visto que a exposição pré-natal excessiva ao Fe afeta o neurodesenvolvimento. Buscar avaliar a indução de comportamento do tipo autista pela exposição ao Fe durante o período de desenvolvimento em *D. melanogaster* possibilita tanto realizar análises mais acuradas de como esse fator exerce seu efeito na etiologia do TEA como colabora com o estabelecimento de um organismo modelo vantajoso no estudo do comportamento do tipo autista, além de possibilitar futuros estudos em terapias com potencial tratamento para o estresse oxidativo, desbalanceamento imunológico e irritabilidade, característicos do TEA. Evidenciar o efeito dos fatores ambientais na etiologia do TEA é de extrema relevância, visto que os sintomas característicos do TEA impactam negativamente a vida do indivíduo.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar alterações comportamentais e bioquímicas relacionadas ao autismo em *D. melanogaster* exposta ao Fe durante o desenvolvimento.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar as concentrações subletais de Fe através de uma curva de eclosão de pupas de *D. melanogaster*;
- Avaliar a peroxidação lipídica através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes SOD e GST;
- Avaliar os comportamentos de geotaxia negativa, *grooming* e interação social em moscas de até 5 dias.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. *Drosophila melanogaster*

Para a realização deste estudo, foram utilizados ovos de *D. melanogaster* da linhagem Harwich. As moscas foram mantidas em temperatura e umidade controladas, 25 °C e 70%, respectivamente, em um ciclo claro/escuro de 12 horas. Os organismos foram mantidos em tubos de vidro (50 x 85 mm) contendo 10 ml de meio de cultura padrão (farinha de milho, sal, gérmen de trigo, leite em pó, açúcar, farinha de soja, farinha de centeio) suplementado com fermento biológico. O antifúngico metilparabeno foi utilizado (Gomes *et al.* 2020).

5.2. Análise de toxicidade e seleção de concentrações de FeSO₄

FeSO₄ em diferentes concentrações diluído em água destilada foi misturado com meio de cultura padrão fresco. As concentrações subletais foram determinadas através da transferência de 50 ovos de *D. melanogaster*, em triplicata, ao recipiente de vidro contendo meio de cultura padrão com diferentes concentrações de FeSO₄ (1, 3, 5, 10, 15 e 20 mM). O grupo controle possuía apenas meio de cultura padrão. As larvas que eclodiram dos ovos foram mantidas no mesmo meio de cultura até o nascimento da mosca adulta. Para calcular a taxa de eclosão, as moscas que eclodiram foram contadas diariamente no período de cinco dias em cada grupo, a partir da primeira eclosão (figura 3). Dados dos grupos tratados e controle foram utilizados na determinação das concentrações subletais de FeSO₄ selecionadas para os experimentos, sendo estas 5 e 15 mM.

5.3. Desenho experimental

Ovos de *D. melanogaster* foram coletados após um intervalo de 12 horas do acasalamento de grupos contendo 150-300 moscas. Os ovos foram coletados e divididos em 3 grupos contendo 100 ovos cada, em triplicata, totalizando 300 ovos por concentração, mantidos em meio de cultura padrão. Os grupos experimentais foram: grupo controle (meio de cultura padrão) e grupos 5 e 15 mM de FeSO₄ (meio de cultura padrão e 200 µl de solução de FeSO₄). Utilizou-se, para todos os grupos, o volume de 10 ml de meio de cultura. Os ovos foram mantidos durante todo o período de desenvolvimento até a eclosão do indivíduo adulto no mesmo meio de cultura. A sobrevivência foi avaliada observando-se a taxa de eclosão das pupas

(Bahadorani & Hilliker 2009). Moscas adultas foram utilizadas nos ensaios comportamentais e bioquímicos. As concentrações de FeSO_4 foram previamente avaliadas baseando-se em estudos anteriores e utilizando curva de sobrevivência (Jimenez-Del-Rio *et al.* 2009).

5.4. Alterações bioquímicas

5.4.1. Enzimas

Para aferir a atividade enzimática espectrofotométrica da GST e SOD, 20 moscas adultas por grupo foram utilizadas, seguindo protocolos anteriormente estabelecidos (Leandro *et al.* 2020 baseado em Habig & Jakoby 1981 e Kostyuk & Potapovich 1989). As amostras foram homogeneizadas utilizando o tissuelyser (5000 x g por 1 minuto) e centrifugadas por 15 minutos a 20.000 x g a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado a fim de determinar as atividades das enzimas. As atividades enzimáticas foram medidas em espectrofotômetro e amostradas em mU/mg de proteína. O valor de proteína total foi analisada usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão, de acordo com Bradford (1976). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.4.2. Peroxidação lipídica

A fim de avaliar a peroxidação lipídica, o método TBARS foi quantificado, seguindo métodos anteriormente descritos (Sachett *et al.* 2020). Foram utilizadas 15 moscas por grupo, em triplicata, colocadas inteiras em tubos de ensaio contendo 150 μl de TBA 0,05 M e 400 μl de tampão TCA 20%, sem passar por homogeneização. As amostras foram deixadas em banho-maria a 95 °C por 30 minutos. Em seguida, foram pipetadas em placas de 96 poços, em triplicata, lidas em 532 nm utilizando uma leitora de microplacas Elisa.

5.5. Ensaio comportamentais

A fim de verificar a reprodução do comportamento do tipo autista em *D. melanogaster*, um conjunto de ensaios comportamentais foi realizado. Moscas com até 5 dias de vida foram utilizadas em todos os ensaios comportamentais. Os grupos analisados foram controle, 5 e 15 mM de FeSO_4 .

5.5.1. Comportamento locomotor

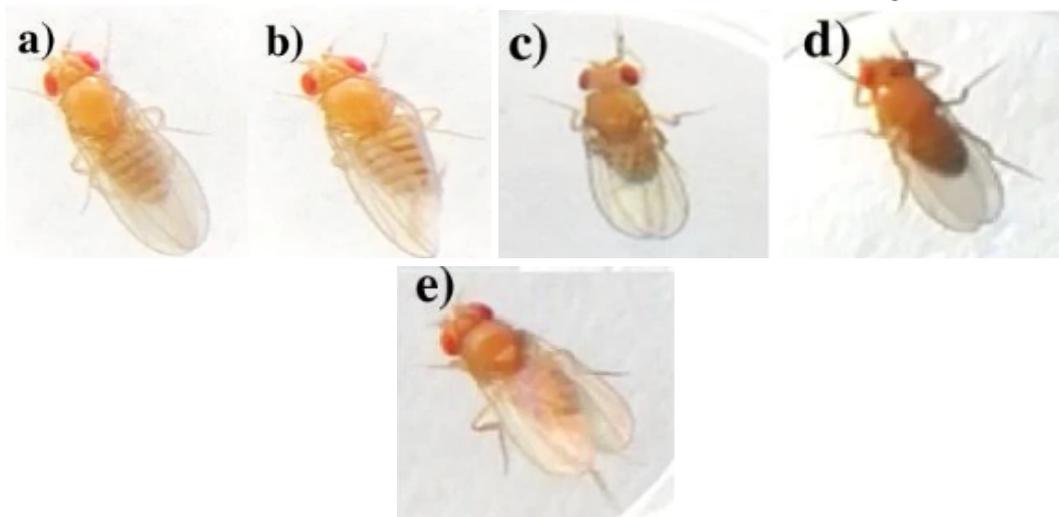
Para análise da atividade locomotora, o teste de geotaxia negativa foi realizado de acordo com Gomes *et al.* (2020). As moscas passaram por

insensibilização temporária por frio, posteriormente colocadas em tubos de vidro verticais fechados (2.5 cm de altura e 1.5 cm de diâmetro). Cada tubo foi preenchido com dez moscas por grupo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Após 30 minutos de habitação, transcorrido o tempo de narcose, as moscas foram impulsionadas ao fundo do tubo e em seguida o número de moscas capazes de escalar 6 cm no tubo foi registrado no período de 60 segundos. O teste foi repetido três vezes em intervalos de 60 segundos cada.

5.5.2. Comportamento do tipo repetitivo

A fim de reproduzir o comportamento repetitivo observado nos humanos autistas, analisa-se o comportamento de *grooming* (limpeza) das moscas, realizado baseando-se em Shilpa *et al.* (2021). Na mosca, os episódios de *grooming* são comportamentos normais e envolvem esfregar partes do corpo com uma perna protorácica ou metatorácica (figura 2). As moscas foram temporariamente insensibilizadas com gelo e colocadas, individualmente, em um poço de uma placa com 12 poços. Após 15 minutos de aclimação, vídeos de 3 minutos foram gravados, capturando os comportamentos de *grooming* de cada mosca. 10 episódios individuais de *grooming* foram registrados por grupo experimental. O tempo gasto por cada mosca realizando o comportamento repetitivo de *grooming* foi analisado.

FIGURA 1: COMPORTAMENTOS DE GROOMING EM *D. melanogaster*.

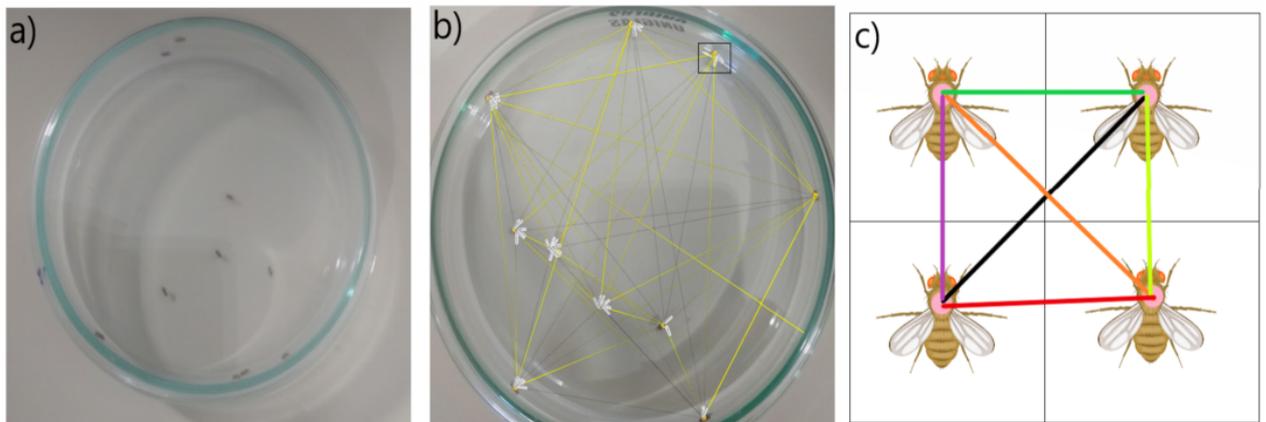


(a) Limpeza do abdômen, (b) limpeza das asas, (c) fricção das patas dianteiras, (d) limpeza da cabeça, e (e) fricção das patas traseiras. FONTE: Shilpa *et al.* 2021.

5.5.3. Interação social

Para aferir as alterações sociais na mosca-da-fruta, um teste de espaço social foi realizado com base em Simon *et al.* (2012). Dez moscas por grupo foram temporariamente insensibilizadas com gelo e colocadas em uma placa circular (150 x 25 mm). As moscas passaram por um período de aclimação durante uma hora. Após o período de aclimação, cinco minutos foram contados e as posições das moscas capturadas em fotografias, registradas a cada 5 minutos no período de 20 minutos (figura 3). O teste foi realizado em triplicata em cada grupo experimental. Depois da captura das imagens, a distância de cada mosca em relação às vizinhas foi medida e avaliada baseando-se em Shilpa *et al.* (2021), com modificações. A distância entre cada mosca com suas vizinhas foi avaliada utilizando uma ferramenta de medidas do software Microsoft Visio. A distância obtida foi convertida em centímetros utilizando uma fórmula de calibração, onde a distância final entre os pontos era obtida através da distância da mosca entre sua vizinha (medida no software) multiplicada pelo diâmetro da placa circular (15 cm), dividido pelo diâmetro da placa circular (medido no software).

FIGURA 2: INTERAÇÃO SOCIAL EM *D. melanogaster*.



(a) placa circular de teste, (b) distância entre cada mosca e suas vizinhas avaliada no software Microsoft Visio, e (c) interação entre cada mosca com suas vizinhas. FONTE: autora com base em Shilpa *et al.* 2021.

5.6. Análise Estatística

Todos os dados obtidos neste trabalho passaram pelo teste de normalidade D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov Smirnov. Os dados paramétricos foram expressos como média \pm desvio padrão da média (SEM) e analisados por One-way ANOVA seguidos pela comparação múltipla de Tukey. Já os dados

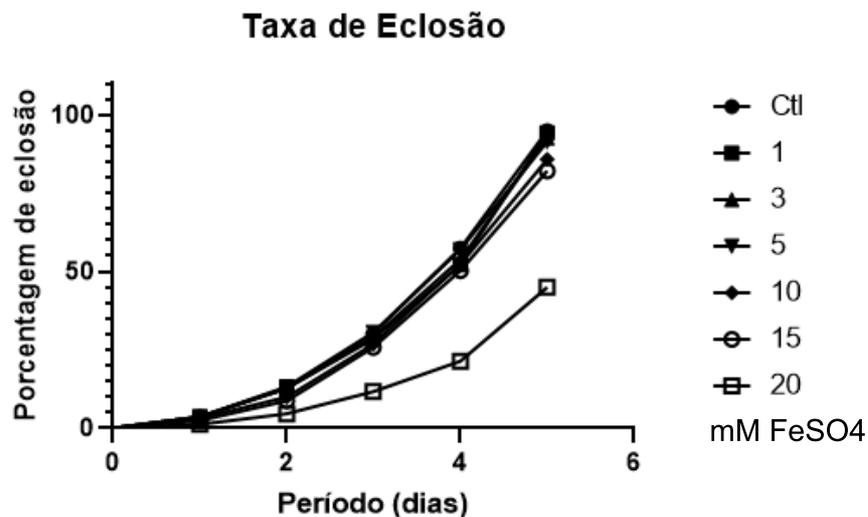
não-paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pela comparação múltipla de Dunn. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Percentual de eclosão

A curva de eclosão permitiu a definição das concentrações que foram usadas neste estudo. Os ovos expostos à solução 20 mM demonstraram taxa de eclosão menor que 50% no período de análise, considerada letal. As concentrações subletais de 5 e 15 mM foram selecionadas.

FIGURA 3: PERCENTUAL DE ECLOSÃO.

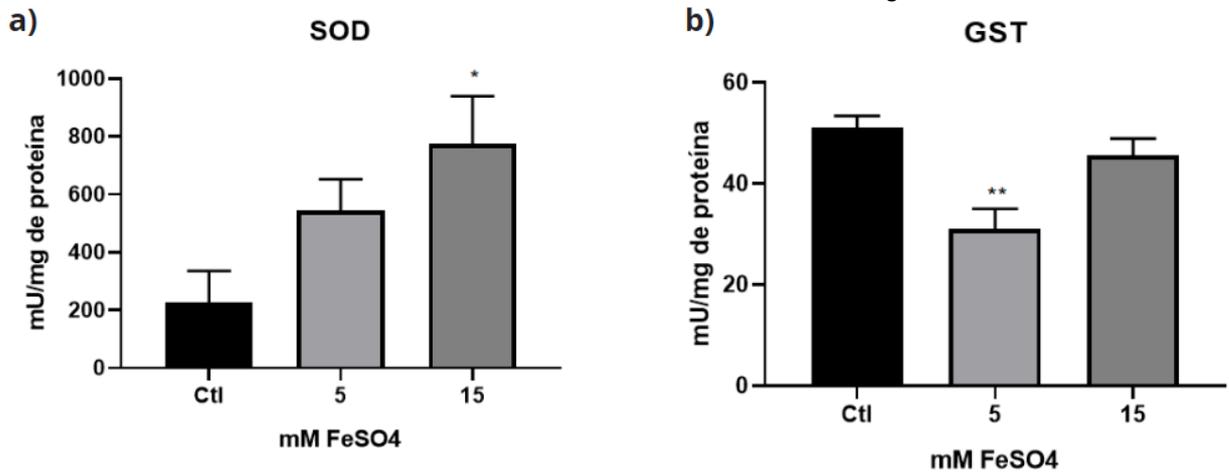


Taxa de eclosão observada no período de 5 dias a partir da primeira eclosão.

6.2. Atividade das enzimas Superóxido Dismutase e Glutathione S-Transferase

As moscas tratadas com Fe apresentaram aumento da atividade da enzima SOD em 4 vezes na maior concentração, sendo que um aumento da atividade foi observado também na concentração de 5 mM, porém não estatisticamente significativo (figura 4A). A atividade da enzima GST foi diminuída em aproximadamente 50% na concentração de 5 mM, sem alterar-se na concentração mais alta (figura 4B).

FIGURA 4: ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM *D. melanogaster*.

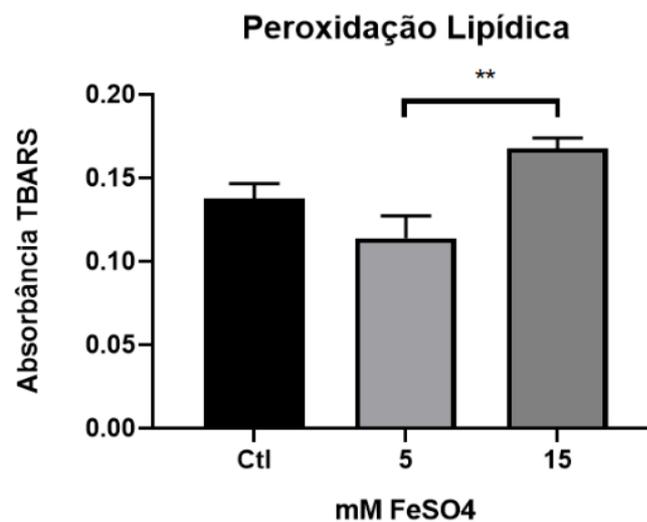


Efeitos da exposição a FeSO₄ na atividade das enzimas (a) Superóxido Dismutase e (b) Glutathiona S-Transferase. Os resultados são representados como média \pm desvio padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada através do teste One-way ANOVA e seguida pela comparação múltipla de Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

6.3. Peroxidação lipídica

Moscas tratadas com Fe demonstraram aumento estatisticamente significativo da peroxidação lipídica entre si, entretanto não quando em comparação com seu controle (figura 5).

FIGURA 5: TBARS EM *D. melanogaster*.

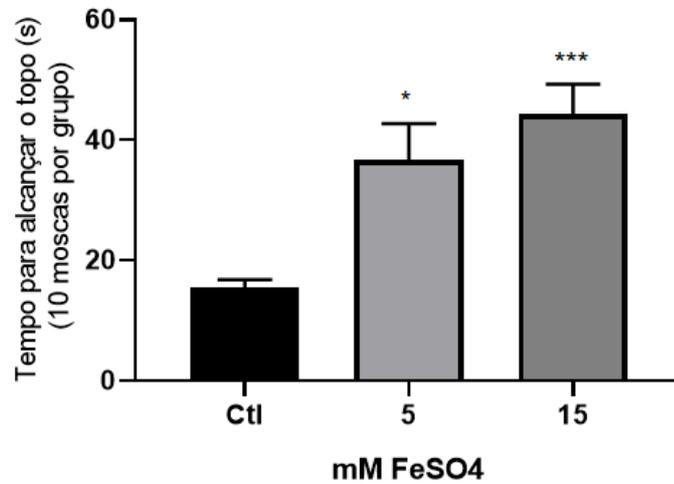


Efeitos da exposição a FeSO₄ na peroxidação lipídica. Os resultados são representados como média \pm desvio padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada através do teste One-way ANOVA e seguida pela comparação múltipla de Tukey. ** $p < 0,01$.

6.2. Capacidade locomotora

A capacidade locomotora foi analisada através do teste de geotaxia negativa, onde observou-se redução da capacidade locomotora nas moscas expostas ao Fe em ambas as concentrações em comparação com o grupo controle (figura 6).

FIGURA 6: CAPACIDADE LOCOMOTORA DE *D. melanogaster*.
Geotaxia Negativa

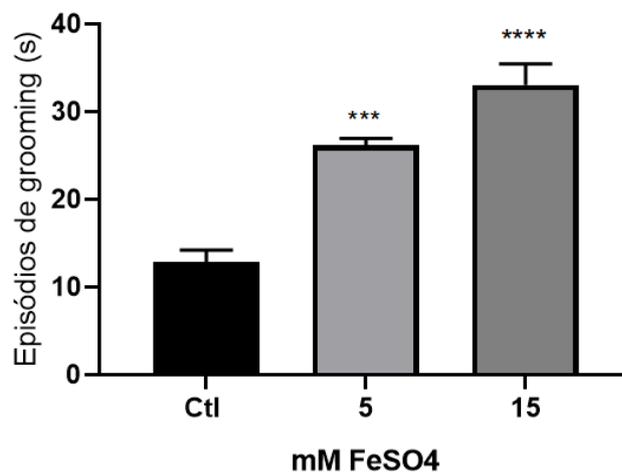


Efeitos da exposição a FeSO₄ na capacidade locomotora. Os resultados são representados como média \pm desvio padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis, seguida pela comparação múltipla de Dunn. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

6.3. Comportamento do tipo repetitivo

O comportamento do tipo repetitivo foi avaliado através da análise de duração dos episódios repetitivos de *grooming*. As moscas expostas ao Fe durante o desenvolvimento apresentaram aumento dos episódios de *grooming* quando comparadas com o controle em ambas as concentrações (figura 7).

FIGURA 7: EPISÓDIOS DE GROOMING EM *D. melanogaster*.
Comportamento do tipo repetitivo

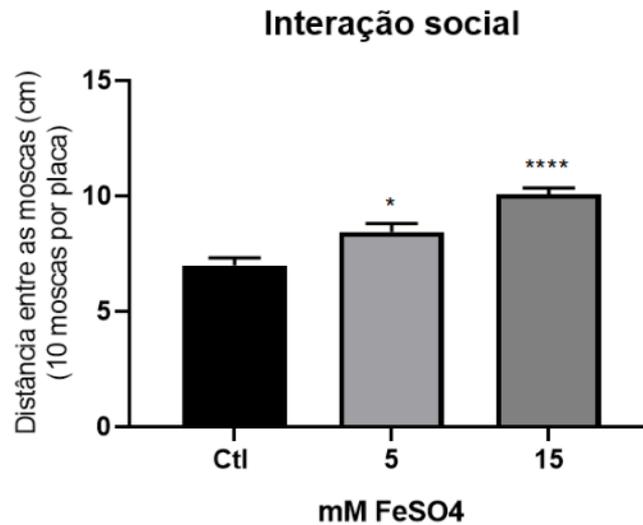


Efeitos da exposição a FeSO₄ na frequência dos episódios repetitivos de *grooming*. A análise estatística foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis, seguida pela comparação múltipla de Dunn. *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

6.4. Interação social

A interação social foi aferida através da distância entre cada mosca e suas vizinhas. As moscas expostas ao Fe durante o desenvolvimento apresentaram maior distância e, conseqüentemente, menor interação entre si quando comparadas com o controle em ambas as concentrações (figura 8).

FIGURA 8: PREJUÍZO NA INTERAÇÃO SOCIAL EM *D. melanogaster*.



Efeitos da exposição a FeSO₄ na interação social. A análise estatística foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis, seguida pela comparação múltipla de Dunn. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$.

7. DISCUSSÃO

Este estudo demonstra um possível papel dos metais pesados, especificamente o Fe, na etiologia de transtornos do neurodesenvolvimento como o TEA. Tanto o excesso quanto a deficiência de Fe estão relacionadas com falhas no neurodesenvolvimento (Schildroth *et al.* 2022). Estudos prévios demonstraram que a exposição excessiva ao Fe durante o desenvolvimento resulta em maior estresse oxidativo, e como o encéfalo apresenta mecanismos protetores fracos, tal estresse acaba afetando o neurodesenvolvimento, facilitando o desenvolvimento de transtornos como o TEA (Pangrazzi *et al.* 2020; Schildroth *et al.* 2022).

Estudos anteriores relacionam a exposição pré-natal a metais pesados com o TEA. Gorini *et al.* (2014) demonstrou que altos níveis de Chumbo (Pb) no plasma estão relacionados com o desenvolvimento de déficits sociais, cognitivos e comunicativos em crianças. Além disso, foi demonstrado que crianças com TEA apresentavam nível plasmático de Pb elevado quando comparadas com crianças não portadoras do transtorno (Gorini *et al.* 2014). Outrossim, Gorini *et al.* (2014)

demonstrou um possível papel do Mercúrio (Hg) na etiologia do TEA, demonstrando o papel deste metal pesado na neuroinflamação, imunomodulação e estresse oxidativo, além de ressaltar a presença de níveis elevados de Hg em crianças portadoras do TEA. Além desses metais, Ijomone *et al.* (2020) demonstrou o papel do Cádmio (Cd) na etiologia do TEA, ressaltando o menor nível deste metal na urina de crianças com TEA em comparação com crianças não portadoras do transtorno, sugerindo uma possível alteração nos mecanismos de degradação dos metais pesados em crianças com autismo, visto que um estudo que avaliou o couro cabeludo de crianças com autismo demonstrou níveis elevados de Cd (Yasuda *et al.* 2013). Em *D. melanogaster*, estudos utilizando Pb como fator etiológico do TEA obtiveram resultados semelhantes aos de estudos com humanos, ressaltando o uso do organismo como modelo dos fatores ambientais no TEA (Shilpa *et al.* 2021).

Neste trabalho, a exposição ao Fe durante o desenvolvimento induziu aumento significativo da atividade da SOD e redução da atividade da GST. A SOD é uma enzima antioxidante que neutraliza os radicais superóxido que são produzidos principalmente ao longo da cadeia transportadora de elétrons, e Altun *et al.* (2018) demonstrou um aumento significativo na atividade enzimática da SOD a nível plasmático em portadores do TEA. A enzima GST age na desintoxicação de xenobióticos às custas de GSH, e está envolvida na regulação de proteínas quinases ativadas por mitógenos, importantes durante o desenvolvimento. Alabdali *et al.* (2014) demonstrou uma redução significativa da atividade da GST a nível plasmático em portadores do TEA), estando de acordo com os resultados obtidos neste trabalho (figura 4).

A peroxidação lipídica é uma reação entre ácidos graxos poliinsaturados e EROs, produzindo peróxidos de lipídios e polímeros de hidrocarbonetos, que são extremamente tóxicos para a célula. Em humanos com TEA, estudos sugerem um aumento dos biomarcadores de peroxidação lipídica em amostras de sangue periférico (González-Fraguela *et al.* 2013). Neste estudo, o Fe induziu a peroxidação lipídica na concentração de 15 mM quando em comparação com a concentração de 5 mM (figura 5). Um estudo utilizando o modelo de autismo induzido por valproato em ratos não observou alterações significativas na peroxidação lipídica em amostras de fígado (Bambini-Junior *et al.* 2011), e um estudo utilizando o modelo de autismo induzido por Pb em *D. melanogaster* demonstrou um aumento significativo da peroxidação lipídica a nível cerebral, entretanto não a nível corporal (Shilpa *et al.*

2021). Desta forma, este parece ser um tópico ainda em discussão nas alterações corporais do TEA, e mais estudos devem ser realizados para colaborar com o correto entendimento da peroxidação lipídica no autismo, subsidiando assim informações mais precisas para que se possa compreender melhor tal resultado.

Neste estudo, a exposição ao Fe durante o desenvolvimento resultou em um conjunto de alterações comportamentais que reproduzem o comportamento do tipo autista em *D. melanogaster* (Shilpa *et al.* 2021). A redução na capacidade locomotora é um dos principais fatores comportamentais no diagnóstico precoce do TEA (Harris 2017). O déficit locomotor em moscas expostas ao Fe durante o desenvolvimento observado neste estudo está de acordo com outros relatos da literatura utilizando drosófilas (Jimenez-Del-Rio *et al.* 2009; Ortega-Arellano *et al.* 2011) e ratos (Maaroufi *et al.* 2009; Kim & Wessling-Resnick 2014).

Dado como fator característico para diagnóstico do TEA, as estereotipias (comportamentos repetitivos) são reproduzidas em *D. melanogaster* através do comportamento de *grooming*. A mosca exposta ao Fe durante o desenvolvimento apresentou comportamento do tipo repetitivo de *grooming* aumentado em relação ao controle (figura 7), similar às estereotipias apresentadas por humanos (White *et al.* 2006; Volkmar & Wiesner 2018). Tanto a maior duração dos episódios de *grooming* quanto o aumento da frequência destes em moscas expostas ao Fe podem ser devidos aos déficits de habituação, hipersensibilidade sensorial ou inibição dos circuitos de limpeza (Ethridge *et al.* 2016). Um padrão equivalente de maior frequência do comportamento de *grooming* foi observado em *D. melanogaster* exposta a Pb durante o desenvolvimento (Shilpa *et al.* 2021). A partir disso, é possível supor que a exposição pré-natal a metais pesados desencadeia o comportamento de *grooming* e outros comportamentos característicos do TEA.

Um fator chave no diagnóstico do TEA é o notável déficit social (Volkmar & Wiesner 2018). Observou-se prejuízo na interação social em *D. melanogaster* exposta ao Fe durante o desenvolvimento, notando-se maior espaço social entre os indivíduos (figura 8). Tal déficit pode estar relacionado com a redução da capacidade locomotora e maior frequência de *grooming* (figuras 6 e 7). Estudos anteriores sugerem que a exposição pré-natal ao Fe afeta negativamente o comportamento social em seres humanos (Ferreira *et al.* 2019), e sabe-se que tanto sua deficiência quanto sua sobrecarga está relacionada com falhas no neurodesenvolvimento em humanos (Schildroth *et al.* 2022). Apesar disso, o Fe é considerado um nutriente

essencial, e poucas pesquisas buscam identificar o papel de substâncias essenciais para o metabolismo na neurotoxicidade (Schildroth *et al.* 2022).

Os neurônios de *D. melanogaster* são sensíveis como os neurônios humanos ao estresse oxidativo e à morte celular advinda da exposição a xenobióticos, como o Fe (Jimenez-Del-Rio *et al.* 2009). Tal sensibilidade pode ser ligada ao fato do Fe apresentar um papel essencial na produção das EROs, entretanto, para evidenciar danos no encéfalo de *D. melanogaster*, mais estudos são necessários. Apesar disso, os dados deste estudo sugerem que a exposição a altas concentrações de Fe durante o período de desenvolvimento pode estar relacionada com a etiologia do TEA. Este estudo demonstrou que a exposição ao Fe durante o desenvolvimento de *D. melanogaster* afeta significativamente parâmetros bioquímicos e comportamentais. Mais estudos são necessários para posterior análise de mecanismos moleculares relacionados ao comportamento do tipo autista em *D. melanogaster*, fornecendo dados mais precisos no estudo do Fe como fator etiológico do TEA.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por fim, este trabalho demonstra que um potencial fator etiológico do TEA pode ser a exposição embrionária ao Fe, visto que *D. melanogaster* tratada com este metal pesado no período de desenvolvimento exibiu comportamento semelhante ao autista humano, como a redução da capacidade locomotora, menor interação social e comportamento repetitivo elevado. Portanto, a exposição a altas concentrações de Fe é capaz de afetar o desenvolvimento normal em *D. melanogaster*, podendo induzir comportamentos similares ao autismo.

Dito isso, este estudo reforça o uso de *D. melanogaster* como modelo para estudar os efeitos de metais pesados na etiologia do TEA. As moscas tratadas com Fe apresentaram comportamento do tipo autista, refletindo algumas das principais características no diagnóstico do TEA em humanos. Ademais, a exposição ao Fe durante o desenvolvimento em *D. melanogaster* reproduz o comportamento do tipo autista na mosca, podendo colaborar com o avanço do estudo de possíveis terapias para os sintomas característicos do TEA, além de possibilitar o estudo da relação entre fatores ambientais e genéticos associados com o TEA.

Com isso, a continuidade deste estudo tem como perspectivas futuras a análise molecular das moscas que sofreram a exposição às altas concentrações de

Fe durante o desenvolvimento a fim de verificar alterações nos genes relacionados ao TEA em *D. melanogaster*, possibilitando o estudo da interação entre fatores ambientais e genéticos. Como a *D. melanogaster* apresenta cerca de 75% de ortólogos funcionais com genes relacionados às doenças em humanos, inúmeros marcadores genéticos relacionados com o TEA podem ser estudados no organismo modelo (Mariano *et al.* 2020). Além disso, há como perspectivas futuras a análise bioquímica a nível cerebral, avaliação de outros fatores comportamentais relacionados ao TEA (como agressividade, aprendizagem e memória) e o estudo de possíveis terapias antioxidantes capazes de melhorar os danos bioquímicos e os comportamentos característicos do TEA.

9. REFERÊNCIAS

- ALABDALI, A.; AL-AYADHI, L.; EL-ANSARY, A. (2014). **A key role for an impaired detoxification mechanism in the etiology and severity of autism spectrum disorders**. Behav Brain Funct 10, 14. DOI: 10.1186/1744-9081-10-14.
- ALTUN, H. *et al.* (2018) **Assessment of malondialdehyde levels, superoxide dismutase, and catalase activity in children with autism spectrum disorders**. Psychiatry and Clinical Psychopharmacology, 28:4, 408-415. DOI: 10.1080/24750573.2018.1470360.
- BAHADORANI, S. & HILLIKER, A. J. (2009). **Biological and Behavioral Effects of Heavy Metals in *Drosophila melanogaster* Adults and Larvae**. Journal of Insect Behavior 22, 399–411. DOI: 10.1007/s10905-009-9181-4.
- BAMBINI-JUNIOR, V. *et al.* (2011). **Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters**. Brain Research, 1408, 8–16. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.06.015.
- BIGOLIN, R. B. (2020). **Poluentes ambientais e sua associação com o desenvolvimento do autismo**. 19 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS.
- BJØRKLUND, G. *et al.* (2021). **The impact of glutathione metabolism in autism spectrum disorder**. Pharmacological Research, 166, 105437. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105437.
- BRADFORD, M. M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical Biochemistry, vol. 72, pp. 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- BRENTANI, H.; POLANCZYK, G. V.; MIGUEL, E. C. (2021). **Brazil and Autism**. In: Volkmar, F.R. (eds) Encyclopedia of Autism Spectrum Disorders. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-91280-6_102021.
- CHERONI, C.; CAPORALE, N.; TESTA, G. (2020). **Autism spectrum disorder at the crossroad between genes and environment: contributions, convergences, and interactions in ASD developmental pathophysiology**. Molecular Autism, 11(1). DOI: 10.1186/s13229-020-00370-1.
- COLL-TANÉ, M.; KREBBERS, A.; CASTELLS-NOBAU, A.; ZWEIER, C.; SCHENCK, A. (2019). **Intellectual disability and autism spectrum disorders ‘on the fly’: insights from *Drosophila***. The Company of Biologists Ltd | Disease Models & Mechanisms. DOI: 10.1242/dmm.039180.
- DEMIR, E. & TURNA, F. (2022). ***Drosophila*: A Promising Model for Evaluating the Toxicity of Environmental Pollutants**. Karaelmas Science and Engineering Journal, vol. 12, no. 1, pp. 101-118. DOI: 10.7212/karaelmasfen.1097904.

ETHRIDGE, L. *et al.* (2016). **Reduced habituation of auditory evoked potentials indicate cortical hyper-excitability in Fragile X Syndrome.** *Transl Psychiatry* 6, e787. DOI: 10.1038/tp.2016.48.

FERREIRA, A.; NEVES, P.; GOZZELINO, R. (2019). **Multilevel Impacts of Iron in the Brain: The Cross Talk between Neurophysiological Mechanisms, Cognition, and Social Behavior.** *Pharmaceuticals*, 12, 126. DOI: 10.3390/ph12030126.

GEORGIEFF, M. & INNIS, S. (2005). **Controversial Nutrients That Potentially Affect Preterm Neurodevelopment: Essential Fatty Acids and Iron.** *Pediatric Research*, 57, 99–103. DOI: 10.1203/01.PDR.0000160542.69840.0F.

GIALLORETI, L. E. *et al.* (2019). **Risk and Protective Environmental Factors Associated with Autism Spectrum Disorder: Evidence-Based Principles and Recommendations.** *Journal of Clinical Medicine*, 8(2), 217. DOI: 10.3390/jcm8020217.

GOMES, K. K. *et al.* (2020). ***Croton campestris* A. St.-Hill Methanolic Fraction in a Chlorpyrifos-Induced Toxicity Model in *Drosophila melanogaster*: Protective Role of Gallic Acid.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–10. DOI: 10.1155/2020/3960170.

GONZÁLEZ-FRAGUELA, M. E. *et al.* (2013). **Oxidative Stress Markers in Children with Autism Spectrum Disorders.** *British Journal of Medicine & Medical Research*, 3(2): 307-317. ISSN : 2231-0614.

GORINI, F.; MURATORI, F.; MORALES, M. A. (2014). **The Role of Heavy Metal Pollution in Neurobehavioral Disorders: a Focus on Autism.** *Rev J Autism Dev Disord* 1, 354–372. DOI: 10.1007/s40489-014-0028-3.

HABIG, W. H. & JAKOBY, W. B. (1981). **Assays for differentiation of glutathione S-transferases.** *Methods Enzymol.* 77, 398e405. DOI: 10.1016/S0076-6879(81)77053-8.

HARRIS, S. R. (2017). **Early motor delays as diagnostic clues in autism spectrum disorder.** *European Journal of Pediatrics*, 176, 1259–1262. DOI: 10.1007/s00431-017-2951-7.

IJOMONE, O. M. *et al.* (2020). **Environmental influence on neurodevelopmental disorders: Potential association of heavy metal exposure and autism.** *J Trace Elem Med Biol*, 62:126638. DOI: 10.1016/j.jtemb.2020.126638.

JIMENEZ-DEL-RIO, M.; GUZMAN-MARTINEZ, C.; VELEZ-PARDO, C. (2009). **The Effects of Polyphenols on Survival and Locomotor Activity in *Drosophila melanogaster* Exposed to Iron and Paraquat.** *Neurochem Res* 35, 227–238. DOI: 10.1007/s11064-009-0046-1.

KANNER, L. (1943). **Autistic Disturbances of Affective Contact.** *Nervous Child*, 2, 217–250. PMID: 4880460.

KAŁUŻNA-CZAPLIŃSKA, J.; ŻURAWICZ, E.; JÓŻWIK-PRUSKA, J. (2017). **Focus on the Social Aspect of Autism**. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 48(5), 1861–1867. DOI: 10.1007/s10803-017-3407-7.

KOSTYUK, V. A. & POTAPOVICH, A. I. (1989). **Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase**. *Biochem. Int.* 19, 1117e1124. PMID: 2561443.

KIM, J. & WESSLING-RESNICK, M. (2014). **Iron and mechanisms of emotional behavior**. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(11), 1101–1107. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2014.07.003.

LEANDRO, L. P. *et al.* (2020). **Behavioral changes occur earlier than redox alterations in developing zebrafish exposed to Mancozeb**. *Environmental Pollution*, 115783. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115783.

LÖNNERDAL, B. (2017). **Excess iron intake as a factor in growth, infections, and development of infants and young children**. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 106 (Suppl 6):1681S-1687S. DOI: 10.3945/ajcn.117.156042.

MAAROUFI, K. *et al.* (2009). **Impairment of emotional behavior and spatial learning in adult Wistar rats by ferrous sulfate**. *Physiology & Behavior*, 96(2), 343–349. DOI: 10.1016/j.physbeh.2008.10.019.

MARIANO, V.; ACHSEL, T.; BAGNI, C.; KANELLOPOULOS, A. K. (2020). **Modelling learning and memory in *Drosophila* to understand Intellectual Disabilities**. *Neuroscience*. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2020.07.034.

MIREKU, M. O. *et al.* (2015). **Prenatal Hemoglobin Levels and Early Cognitive and Motor Functions of One-Year-Old Children**. *Pediatrics*, 136(1):e76-83. DOI: 10.1542/peds.2015-0491.

NUNES, M. E. M. *et al.* (2019). **Acute Exposure to Permethrin Modulates Behavioral Functions, Redox, and Bioenergetics Parameters and Induces DNA Damage and Cell Death in Larval Zebrafish**. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–19. DOI: 10.1155/2019/9149203.

ORTEGA-ARELLANO, H. F.; JIMENEZ-DEL-RIO, M.; VELEZ-PARDO, C. (2011). **Life Span and Locomotor Activity Modification by Glucose and Polyphenols in *Drosophila melanogaster* Chronically Exposed to Oxidative Stress-stimuli: Implications in Parkinson's Disease**. *Neurochemical Research* 36, 1073–1086. DOI: 10.1007/s11064-011-0451-0.

PANGRAZZI, L.; BALASCO, L.; BOZZI, Y. (2020). **Oxidative Stress and Immune System Dysfunction in Autism Spectrum Disorders**. *International Journal of Molecular Sciences*. 21, (9):3293. DOI: 10.3390/ijms21093293.

RAMASWAMI, G. & GESCHWIND, D. H. (2018). **Genetics of autism spectrum disorder**. *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 147, Neurogenetics, Part I, 321–329. DOI: 10.1016/b978-0-444-63233-3.00021-x.

SACHETT, A. *et al.* (2020). **Quantification of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) optimized for zebrafish brain tissue.** Protocols.io. DOI: 10.17504/protocols.io.bjp8kmrw.

SANTOS-TERRA, J. *et al.* (2021). **Transcription factors in neurodevelopmental and associated psychiatric disorders: A potential convergence for genetic and environmental risk factors.** International Journal of Developmental Neuroscience, 1-34. DOI: 10.1002/jdn.10141.

SCHILDROTH, S. *et al.* (2022). **Environmental Metal Exposure, Neurodevelopment, and the Role of Iron Status: a Review.** Curr Envir Health Rpt 9, 758–787. DOI: 10.1007/s40572-022-00378-0.

SHILPA, O. *et al.* (2021). **Lead (Pb)-induced oxidative stress mediates sex-specific autistic-like behaviour in *Drosophila melanogaster*.** Mol Neurobiol 58, 6378–6393. DOI: 10.1007/s12035-021-02546-z.

SIMON, A. F. *et al.* (2012) **A simple assay to study social behavior in *Drosophila*: measurement of social space within a group.** Genes Brain Behav 11(2):243–252. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2011.00740.x.

SUZUKI, K. *et al.* (2011). **Reduced Acetylcholinesterase Activity in the Fusiform Gyrus in Adults With Autism Spectrum Disorders.** Arch Gen Psychiatry, 68(3):306–313. DOI: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.4.

TAMURA, T. *et al.* (2002). **Cord serum ferritin concentrations and mental and psychomotor development of children at five years of age.** The Journal of Pediatrics, 140:165–70. DOI: 10.1067/mpd.2002.120688.

VOLKMAR, F. R. & WIESNER, L. A. (2018). **Autismo: Guia Essencial para Compreensão e Tratamento.** Artmed, 1ª edição. ISBN 9788582715222.

WHITE, S. W.; KEONIG, K.; SCAHILL, L. (2006). **Social Skills Development in Children with Autism Spectrum Disorders: A Review of the Intervention Research.** Journal of Autism and Developmental Disorders, 37:1858–1868. DOI: 10.1007/s10803-006-0320-x.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2022) **Autism spectrum disorders.** Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>>. Acesso realizado em: 19 de Abril de 2022.

YANG, L. *et al.* (2010). **Influence of hemoglobin level during early gestation on the development of cognition of pre-school children.** Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi, 31(12):1353-8. PMID: 21223663.

YASUDA, H.; YASUDA, Y.; TSUTSUI, T. (2013). **Estimation of autistic children by metallomics analysis.** Sci Rep 3, 1199. DOI: 10.1038/srep01199.